

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

01.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 4月 1日

出願番号

Application Number:

特願2002-099339

[ST.10/C]:

[JP2002-099339]

REC'D 23 MAY 2003

WIPO

PCT

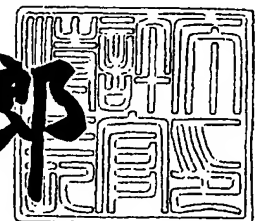
出願人
Applicant(s):科学技術振興事業団
国立身体障害者リハビリテーションセンター総長

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033802

Best Available Copy

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02079-YS

【提出日】 平成14年 4月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明の名称】 蛍光蛋白質融合プローブを用いたスクリーニング方法

【請求項の数】 3

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市若松 3 - 4 6 - 5 0

 【氏名】 加藤 誠志

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都西東京市保谷町 4 - 5 - 6
 ノグチハイツ 2 0 7 号

 【氏名】 藤森 史江

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

 【識別番号】 391034994

 【氏名又は名称】 国立身体障害者リハビリテーションセンター総長

【代理人】

 【識別番号】 100093230

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西澤 利夫

 【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 009911

 【納付金額】 12,600円

【その他】 国以外の全ての持分の割合 6 0 / 1 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光蛋白質融合プローブを用いたスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体上に固定配置した複数の標的候補物質の中からプローブ蛋白質が結合する標的物質をスクリーニングする方法であって、プローブ蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質である蛍光蛋白質融合プローブを調製し、この蛍光蛋白質融合プローブを全ての標的候補物質に接触させた後、蛍光蛋白質の蛍光シグナルを検出することによって、プローブ蛋白質が結合した標的物質を同定することを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項2】 プローブ蛋白質をコードするポリヌクレオチドと蛍光蛋白質をコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドのインビトロ転写・翻訳産物として蛍光蛋白質融合プローブを調製する請求項1のスクリーニング方法。

【請求項3】 担体上に固定配置した標的候補物質が標的蛋白質を含む細胞集団である請求項1のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、プローブ蛋白質と各種物質との相互作用を調べるために利用できる、蛍光蛋白質融合プローブを用いた標的物質スクリーニング方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ゲノムプロジェクトにおいて多くの新規遺伝子が発見されている。これらの遺伝子がコードしている蛋白質の機能を調べたり、これらの蛋白質を利用して新しい医薬品を開発するためには、これらの蛋白質と結合する物質を見つける必要がある。そこで、そのためのアッセイ法が種々開発されてきた (E. M. Phizicky and S. Fields, Microbiol. Rev. 59:94-123, 1995; A. R. Mendelsohn and R. Brent, Science 284: 1948-1950, 1999)。最も一般的な方法は、複数の標的候補

物質を担体上に固定配置し、これに標識したプローブを作用させて、結合するかどうかを調べる方法である。

【0003】

プローブが蛋白質の場合、まずプローブとなる蛋白質の調製を行なう必要がある。多くの場合、蛋白質をコードしているcDNAの発現ベクターを各種細胞に導入して組換え蛋白質を発現させる。発現した蛋白質を単離精製し、ラジオアイソトープ、蛍光色素、酵素などで標識を行なったのちプローブとして用いる。検出の容易さから、蛍光色素による標識が多く使われる。

【0004】

一方、蛋白質の蛍光標識物質として、発光クラゲ由来の蛍光蛋白質が知られている。この蛍光蛋白質を細胞内で発現させると細胞内で蛍光シグナルを発するため、蛍光蛋白質を細胞内蛋白質に融合させたものを細胞内で発現させ、蛍光の発光部位から蛋白質の局在部位を調べることが可能である (R. Rizzuto et al., Curr. Biol. 5: 635-642, 1995)。また、蛍光蛋白質と任意の蛋白質との融合蛋白質を大腸菌 (J. C. Lewis and S. Daunert, Anal. Chem. 71: 4321-4327, 1999) やインビトロ転写・翻訳 (T. W. Kahn et al., Curr. Biol. 7: R207-R208, 1997) で作製した例は報告されている。しかしながら、そのような蛍光蛋白質融合蛋白質を標的物質のスクリーニング用プローブとして用いた例は無い。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

最近、DNAチップ、蛋白質チップ、化合物チップなどのように、担体上の微小領域に標的候補物質がマイクロアレイ状に固定配置されたものが利用可能になってきた。それにともない、微量のプローブによって多数の標的候補物質をスクリーニングすることが可能となっている。しかしながら、従来の標識プローブ蛋白質の調製には、蛋白質と標識物質との共有結合、イオン結合、疎水結合、またはマレイミド化合物等の架橋剤を用いた結合等を多大な労力と時間をかけて行う必要があった。そしてそのような多大な労力や時間はプローブ量の多寡に関わりなく必要とされるため、DNAチップ等の普及によってプローブ量が低量化されることの恩恵は僅かであると言わざると得ない。

【0006】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、簡便に調製することのできる蛍光標識蛋白質プローブを用いた標的物質のスクリーニング方法を提供することを課題としている。

【0007】

【発明を解決するための手段】

この出願の発明は、前記の課題を解決するための発明として、担体上に固定配置した複数の標的候補物質の中からプローブ蛋白質が結合する標的物質をスクリーニングする方法であって、プローブ蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質である蛍光蛋白質融合プローブを調製し、この蛍光蛋白質融合プローブを全ての標的候補物質に接触させた後、蛍光蛋白質の蛍光シグナルを検出することによって、プローブ蛋白質が結合した標的物質を同定することを特徴とするスクリーニング方法を提供する。

【0008】

この発明の方法においては、プローブ蛋白質をコードするポリヌクレオチドと蛍光蛋白質をコードするポリヌクレオチドとの融合ポリヌクレオチドのインビトロ転写・翻訳産物として蛍光蛋白質融合プローブを調製することを好ましい態様としている。

【0009】

またこの発明の方法においては、担体上に固定配置した標的候補物質が標的蛋白質を含む細胞集団であることを別の好ましい態様としている。

【0010】

以下、実施形態を示し、前記の各発明について詳しく説明する。

【0011】

【発明の実施の形態】

この発明において「プローブ蛋白質」とは、標的物質との特異的な結合性によって複数の標的候補物質の中から目的とする標的物質をスクリーニングするための蛋白質あるいはペプチドである。プローブ蛋白質は、ヒトを含めたあらゆる生物種由来の、あらゆる蛋白質を対象とすることができる。その機能が既知であっ

てもよく、あるいは機能未知のものであってもよい。プローブ蛋白質のアミノ酸配列、およびそれをコードするDNA配列は未知であってもよいが、既知であることが好ましい。アミノ酸配列は、天然に存在する蛋白質由来の配列であっても、人工的にデザインした配列であってもよい。さらにこのプローブ蛋白質は、天然蛋白質のアミノ酸配列における一部連続配列からなるポリペプチドまたはオリゴペプチドであってもよい。

【0012】

「複数の標的候補物質」は、プローブ蛋白質と特異的に結合する「標的物質」を含んでいる可能性のある物質集団であり、そのような物質は核酸（DNA、RNAなど）、糖類、蛋白質、合成ペプチド、細胞、有機化合物などの天然物質または合成物質等から適宜に選択される。この発明においては、標的物質が蛋白質であり、そのような標的蛋白質を含有する細胞集団を標的候補物質とすることを好ましい態様としている。

【0013】

標的物質とプローブ蛋白質との「特異的な結合」とは、例えば両者を構成する複数の分子間の水素結合、疎水結合、イオン結合、配位結合等に基づく結合である。

【0014】

複数の標的候補物質は、担体上に固定配置されている。「担体」は通常のDNAチップや蛋白質チップ等を使用されるスライドガラス等の透明プレートを使用することできる。「固定配置」とは、スポッティング方法等によって担体上の所定位置に各標的候補物質が整列配置されており、その位置によって各標的候補物質の種類が特定可能な状態を意味する。なお、プローブ量をできるだけ少量で済ますためには、担体上のできるだけ狭い範囲に標的候補物質を固定配置することが望ましい。

【0015】

この発明の方法においては、プローブ蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質である蛍光蛋白質融合プローブを調製する。「蛍光蛋白質」とは励起光を照射すると蛍光を発する蛋白質であり、例えば、発光クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質(GFP)や

、その変異体であるEGFP、EYFP（黄色蛍光）、ECFP（青色蛍光）、DsRed1（赤色蛍光）、DsRed2、ウミシイタケ由来の緑色蛍光蛋白質hrGFPなどが例示できる。

【0016】

プローブ蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質は、遺伝子工学的手法によって調製する。すなわち、プローブ蛋白質をコードするポリヌクレオチドに発光蛋白質をコードするポリヌクレオチドを融合させた融合ポリヌクレオチドを作製し、適当な発現ベクターに組み込んで、蛍光蛋白質融合プローブの発現ベクターを作製する。「ポリヌクレオチド」は、蛋白質をコードするDNA断片やRNA断片であり、特に蛋白質cDNAまたはそのコード領域のDNA断片が好ましい。このような発現ベクターから発現される蛍光蛋白質融合プローブは、プローブ蛋白質上の結合部位が蛍光蛋白質との融合によって遮蔽されない限りは、プローブ蛋白質と蛍光蛋白質の順序は、いずれがN末端側であってもよい。また、プローブ蛋白質と蛍光蛋白質の間に、スペーサーペプチドを介在させてもよい。

【0017】

融合ポリヌクレオチドの発現は、インビトロ転写・翻訳を好ましい態様とするが、適当な宿主細胞を用いて行うこともできる。

【0018】

発光蛋白質融合プローブを、インビトロ転写・翻訳産物として調製する場合には、融合ポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼプロモーターを有する発現ベクターに組換え、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物、小麦胚芽抽出物、大腸菌溶解物などのインビトロ転写・翻訳系に添加すれば、蛍光蛋白質融合プローブをインビトロで調製することができる。インビトロ転写とインビトロ翻訳は別々に行なっても良い。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II、pIVEX系などが例示できる。

【0019】

蛍光蛋白質融合プローブを、大腸菌などの微生物を用いて調製する場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクロ

ーニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、融合ポリヌクレオチドを組換えた発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すれば、この融合ポリヌクレオチドがコードする融合蛋白質を微生物内で大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。

【0020】

蛍光蛋白質融合プローブを、真核細胞を用いて調製する場合には、融合ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに組換え、真核細胞内に導入すれば、蛍光蛋白質融合プローブを真核細胞内で生産することができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、蛍光蛋白質融合プローブを発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。

【0021】

蛍光蛋白質融合プローブをインビトロ転写・翻訳あるいは原核細胞や真核細胞で発現させたのち、得られた細胞溶解物をそのままプローブとして用いることができる。もし、培養物から目的の蛍光蛋白質融合プローブを単離精製する場合には、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどがあげられる。

【0022】

この発明の方法においては、前記のとおり蛍光蛋白質融合プローブを調製した後、この蛍光蛋白質融合プローブを全ての標的候補物質に接触させる。標的候補物質の中に目的とする標的物質が存在する場合には、その標的物質に蛍光蛋白質

質融合プローブが特異的に結合する。各々の標的候補物質は担体上の所定位置に配置されているため、蛍光蛋白質の蛍光シグナルの位置を検出することによって、プローブ蛋白質が結合した標的物質を同定することができる。

【0023】

蛍光シグナルの検出は、蛍光顕微鏡や蛍光スライドスキャナーを用いて行うことができる。標的候補物質が担体上に高密度で配置されている場合には、蛍光顕微鏡観察によって蛍光シグナルを検出する方法が好ましい。

【0024】

【実施例】

次に実施例を示して、この出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明はこれらの例に限定されるものではない。なお、DNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献（"Molecular Cloning. A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989）に従った。制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

【0025】

この実施例では、核蛋白質であるNpw38とNpwBPとの結合をモデル相互作用として選び、NpwBPをプローブ蛋白質、Npw38を標的蛋白質としてスクリーニングを実施した例を示す。すなわちNpw38のWWドメインが、NpwBPのPGRモチーフに結合することが知られている（A. Komuro et al., J. Biol. Chem. 274: 36513-36519, 1999）。そこで、プローブ蛋白質としてNpwBPのPGRモチーフを含むペプチドを選択した。このペプチドを蛍光蛋白質と融合させたものを蛍光蛋白質融合プローブとして用い、膜局在化Npw38を発現した細胞を含む細胞チップをスクリーニングした例を示す（図1参照）。

実施例1：発現ベクターの作製

(1) 蛍光蛋白質発現ベクター

pEGFP-N1、pDsRed2-N1（いずれもClontech社）のそれぞれから調製した蛍光蛋白質（EGFP、DsRed2）のcDNAを含むEcoRI-NotI断片をpKA1（Kato et al., Gene 150:243-250, 1994）のEcoRI-NotIに挿入し、蛍光蛋白質発現ベクターpKA1-EGFP

-N1、pKA1-DsRed2-N1を作製した。

(2) 蛍光蛋白質融合プローブ発現ベクター

NpwBPのPGRモチーフペプチドとGFPとの融合蛋白質(図2(a)参照)を発現するベクターpKA1-NpwBP(P2)-GFP(特開2001-327296号公報に記載)を蛍光蛋白質融合プローブ発現ベクターとして用いた。このベクターは、cDNAの上流にT7 RNAポリメラーゼプロモータが存在するので、T7 RNAポリメラーゼを作用させると、インビトロで転写が起こり、融合蛋白質をコードするmRNAが合成できる(図1参照)。

(3) GPCL融合蛋白質発現ベクターの作製

ヒトグリコホリンC様蛋白質(GPCL)をコードするcDNAを有するpHP10524(WO 00/00506号公報に記載)を鋳型にして、T7プライマーと、終止コドンの下流にSmaI部位を付加したプライマーを用いてPCR産物を調製した。このPCR産物をEcoRIとSmaIで消化した後、前記(1)で作製した蛍光蛋白質発現ベクターpKA1-EGFP-N1、pKA1-DsRed2-N1のそれぞれのEcoRI-SmaI開裂部位に挿入し、膜局在化蛍光蛋白質発現ベクターpKA1-GPCL-EGFP、pKA1-GPCL-DsRed2を作製した。

(4) GPCL-Npw38融合蛋白質発現ベクターの作製

pKA1-Npw38(A. Komuro et al., Nucl. Acids Res. 27: 1957-1965, 1999)を鋳型にして、開始コドンの上流にSmaI部位を付加したプライマーと、T3プライマーを用いてPCR産物を調製した。このPCR産物をSmaIとNotIで消化した後、前記(3)で作製した膜局在化蛍光蛋白質発現ベクターpKA1-GPCL-EGFPのSmaI-NotI開裂部位に挿入し、GPCL-Npw38融合蛋白質発現ベクターpKA1-GPCL-Npw38を作製した。融合蛋白質GPCL-Npw38の模式図を図2(b)に示す。

(5) GPCL-Npw38-DsRed2融合蛋白質発現ベクターの作製

pKA1-Npw38を鋳型にして、開始コドンの上流にSmaI部位を付加したプライマーと、Npw38の内部にあるSmaI部位を含むプライマーを用いてPCR産物を調製した。このPCR産物をXmaIで消化した後、前記(3)で作製した膜局在化蛍光蛋白質発現ベクターpKA1-GPCL-DsRed2のXmaI開裂部位に挿入し、GPCL-Npw38-DsRed2融合蛋白質発現ベクターpKA1-GPCL-Npw38-DsRed2を作製した。融合蛋白質GPCL-Npw38-DsRed2の模式図を図2(c)に示す。

実施例2：細胞チップの作製

(1) 培養細胞

ヒトフィブロサルコーマ細胞株HT-1080は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中、5% CO₂ 存在下、37℃で培養した。2×10⁵個のHT-1080細胞を6ウェルマルチディッシュ (ヌンク社) に植え、5% CO₂ 存在下、37℃で22時間培養した。培地除去後、リン酸緩衝液 (PBS) で細胞表面を洗浄し、さらに10%FBSを含むDMEM 1.5 mlを添加した。

(2) 細胞への発現ベクターの導入

実施例1(2)と(3)で作製した発現ベクター (pKA1-GPCL-Npw38、pKA1-GPCL-Npw38-DsRed2、あるいはGPCLのみを発現する対照ベクターとしてpHP10524) の溶液1 μl (1.5 μg相当) を無血清DMEM 100 μlに添加したのち、トランスフェクション試薬PolyFectTM (キアゲン社) 10 μlと混合し10分間室温でインキュベートすることによってDNA複合体を形成した。前記(1)の培養細胞HT-1080をPBSで一回洗浄し、10%FBSを含むDMEM 1.5 mlを添加した。先に調製したDNA複合体に10%FBSを含むDMEM 600 μlを添加したものを、この細胞に添加し、5% CO₂ 存在下、37℃で2時間培養した。

(3) 融合蛋白質発現細胞の担体への固定

前記(2)で作製した融合蛋白質発現細胞を、それぞれ0.05%トリプシン-EDTA溶液1 mlと37℃で5分間反応させて培養基材から剥離した。10% FBSを含むDMEM 2 mlを添加して細胞を回収したのち、この融合蛋白質発現細胞を2×10⁵細胞/mlになるように調製し、GPCLのみを発現させた細胞と均一に混合した。この細胞混合懸濁液1 mlをコラーゲンIカルチャースライド (ファルコン社) に蒔き、5% CO₂ 存在下、37℃でさらに40時間培養した。細胞をPBSで洗浄した後、細胞をPBSで洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド含有PBSで室温15分間固定し、細胞チップを作製した。

実施例3：蛍光蛋白質融合プローブの調製

実施例1(2)に記載したpKA1-NpwBP(P2)-GFP 1 μgを、インビトロ転写/翻訳反応キット (プロメガ社) に付属のT_NT^R Quick Master Mix 40 μl、1 mMメチオニン1 μlを含む総量 50 μlの溶液に添加して、30℃で12時間反応させた。この

反応液をそのままスクリーニング用プローブとして用いた。反応液の一部をとってPBSで200倍希釈したのち、蛍光分光光度計で蛍光スペクトル（励起光：488 nm）を測定した結果を図3に示す。510 nmに極大を持つ蛍光発光が観測され、翻訳産物である融合蛋白質NpwBP(P2)-GFPが、GFPとして機能していることが示された。

実施例4：蛍光蛋白質融合プローブを用いたスクリーニング

実施例2で作製したGPCL-Npw38発現細胞を含む細胞チップをPBSで洗浄した後、0.1% Triton X-100で氷上15分間処理した。このチップ上の細胞に実施例3で調製した蛍光蛋白質融合プローブNpwBP(P2)-GFP 20 μ lを添加して封入後、4℃で20時間反応させた。0.05 % Tween20含有PBSで3回洗浄後、封入し共焦点蛍光顕微鏡（Bio-Rad社MRC1024ES）で観察した。その結果、核の周辺部の小胞体に緑色蛍光を発する細胞が認められた（図4(a)、(b)）。この蛍光発光部位が、GPCL-Npw38の局在と一致することを確認するために、GPCL-Npw38にさらに赤色蛍光蛋白質DsRed2を融合させたGPCL-Npw38-DsRed2を発現させた細胞を含む細胞チップを用いて、同様の実験を行なった。その結果、GPCL-Npw38の場合と同様に、核の周辺部の小胞体に緑色蛍光を発する細胞が認められた（図4(c)）。しかも、この緑色蛍光発光部位は、GPCL-Npw38-DsRed2の局在部位を示す赤色蛍光発光部位と一致したことから（図4(d)、(e)）、蛍光蛋白質融合プローブNpwBP(P2)-GFPは、GPCL-Npw38-DsRed2と結合していることが確認された。なお、GPCLのみを発現している細胞には、プローブの結合は認められないことから、この結合はNpw38を介していることが示された。

【0026】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、プローブ蛋白質と標的物質との結合スクリーニングを簡便に行うこと可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

インビトロ転写・翻訳によって調製した蛍光蛋白質融合プローブを用いて、標的蛋白質を発現する細胞を含む細胞チップをスクリーニングする方法を模式的に

表示した図である。

【図2】

この出願の発明に用いた融合蛋白質の構造を表示した図である。NpwBP(P2)-EGFP (a)、GPCL-Npw38 (b)、GPCL-Npw38-DsRed2 (c) をそれぞれ示す。

【図3】

インビトロ転写・翻訳によって調製した蛍光蛋白質融合プローブの蛍光スペクトルを表示した図である。

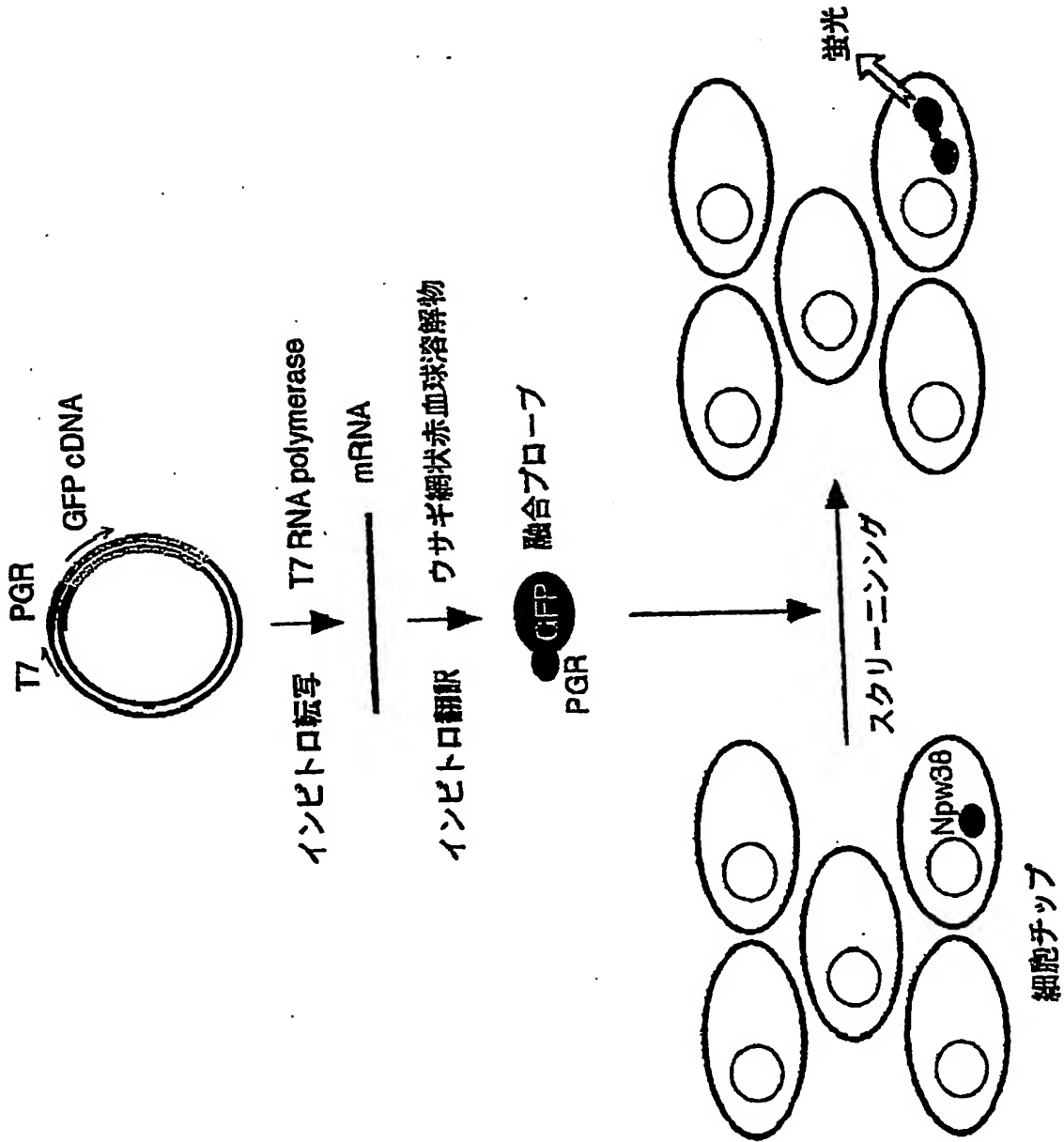
【図4】

蛍光蛋白質融合プローブが細胞チップの標的蛋白質と結合した時の蛍光発光を観察した共焦点顕微鏡写真であって、GPCL-Npw38発現細胞を含む細胞チップを用いた場合の緑色蛍光 (a)、これを微分干渉像と重ね合わせたもの (b)、GPCL-Npw38-DsRed2を発現させた細胞を含む細胞チップを用いた場合の緑色蛍光 (c) と赤色発光 (d)、両者を微分干渉像と重ね合わせたもの (e) を表示した図である。

【書類名】

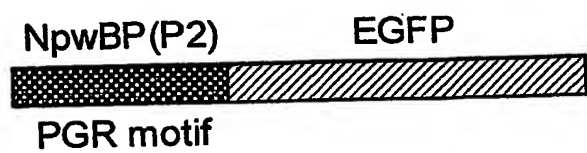
図面

【図1】

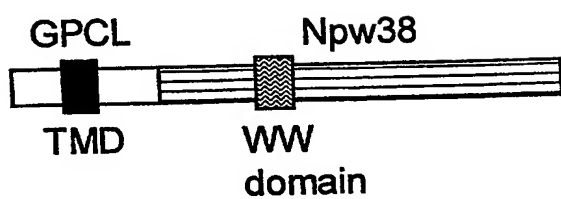


【図 2】

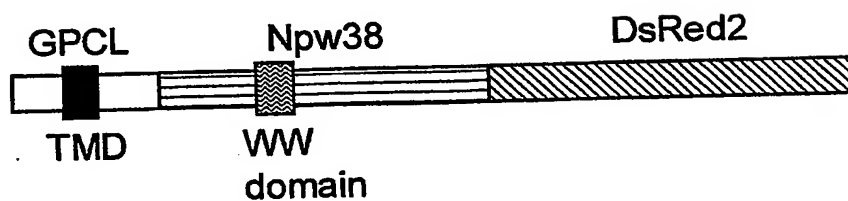
(a) NpwBP(P2)-EGFP



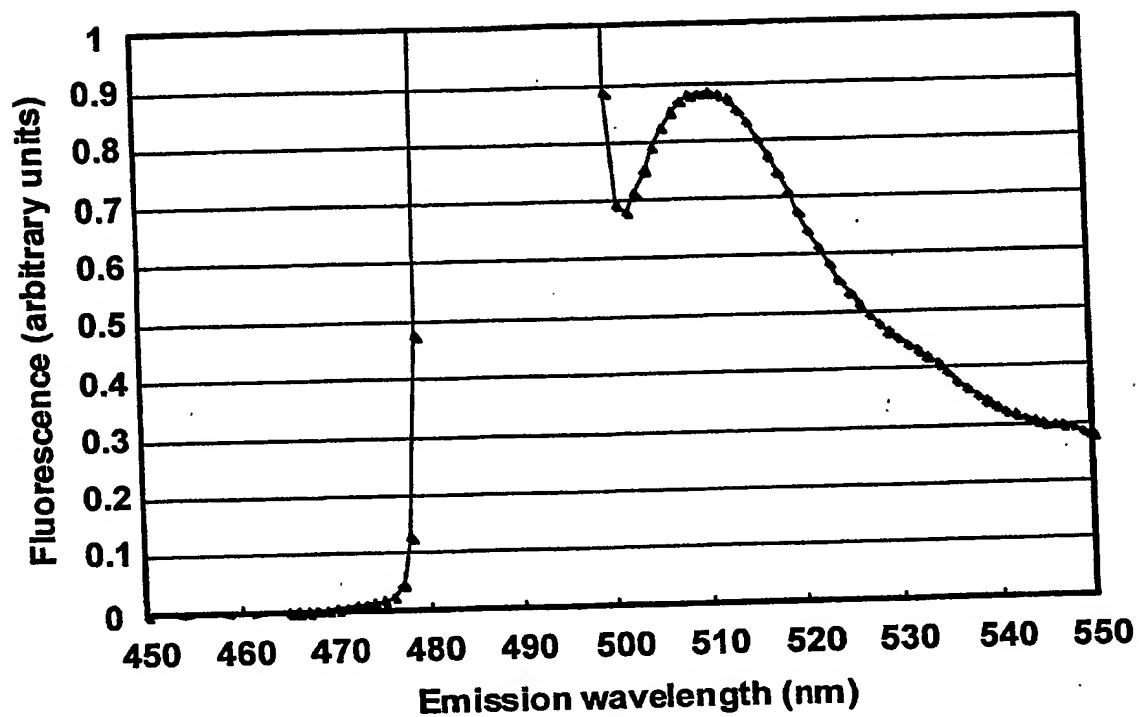
(b) GPCL-Npw38



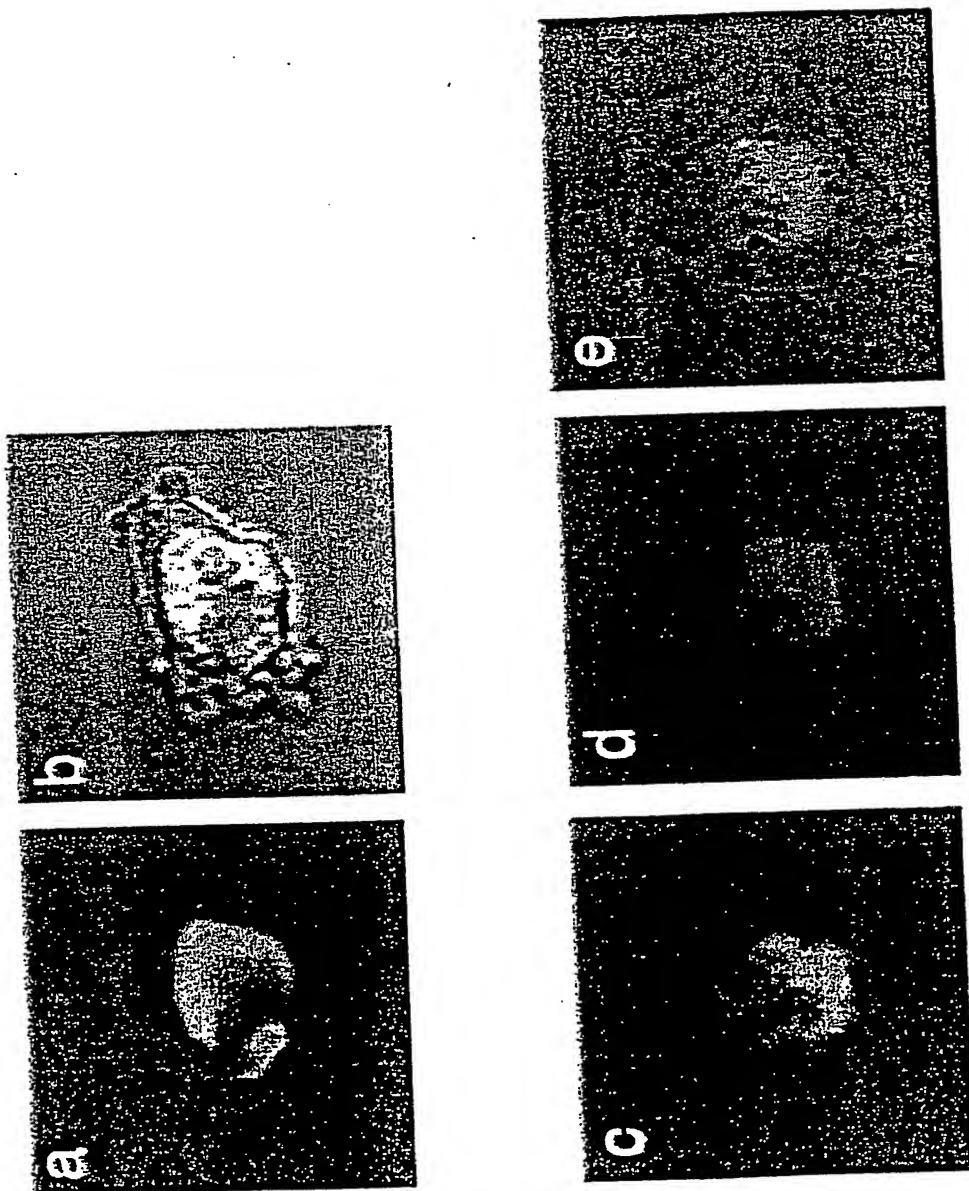
(c) GPCL-Npw38-DsRed2



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プローブ蛋白質と標的物質との結合スクリーニングを簡便に行うための方法を提供する。

【解決手段】 担体上に固定配置した複数の標的候補物質の中からプローブ蛋白質が結合する標的物質をスクリーニングする方法であって、プローブ蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質である蛍光蛋白質融合プローブを調製し、この蛍光蛋白質融合プローブを全ての標的候補物質に接触させた後、蛍光蛋白質の蛍光シグナルを検出することによって、プローブ蛋白質が結合した標的物質を同定する。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[391034994]

1. 変更年月日

1991年 4月17日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県所沢市並木4丁目1番地

氏 名

国立身体障害者リハビリテーションセンター総長

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.